



TITLE:

Modelling urea-cycle disorder citrullinemia type 1 with disease- specific iPSCs(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Uebayashi(Yoshitoshi), Elena Yukie

CITATION:

Uebayashi(Yoshitoshi), Elena Yukie. Modelling urea-cycle disorder citrullinemia type 1 with disease-specific iPSCs. 京都大学, 2017, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2017-09-25

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k20661>

RIGHT:

許諾条件により本文は2018-04-01に公開; Copyright © 2017 Elsevier Inc.
All rights reserved.

京都大学	博士（ 医 学 ）	氏 名	上林(吉利) エレーナ幸江
論文題目	Modelling urea-cycle disorder citrullinemia type 1 with disease-specific iPSCs （尿素サイクル異常シトルリン血症 1 型の疾患特異的 iPS 細胞を用いた病態解析）		
<p>（論文内容の要旨）</p> <p>【 目 的 】</p> <p>シトルリン血症 1 型 (CTLN1) は、尿素サイクル酵素アルギニノコハク酸シンテターゼ (ASS) をコードする <i>ASS1</i> 遺伝子の変異により発症する尿素サイクル異常症である。新生児期に発症し、致死的高アンモニア血症を呈するが、肝移植以外に根治的治療法のない難治性疾患である。</p> <p>ヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) は患者の体細胞を遺伝子導入により初期化することで樹立され、あらゆる体細胞への分化能を有する。今回 CTLN1 に対する新たな治療戦略を見出す系を開発するために、CTLN1 患者体細胞から iPS 細胞を樹立し、肝細胞様細胞 (HLC) へ分化誘導することで病態解析を行った。</p> <p>【 方法・結果 】</p> <p>CTLN1 患者の末梢血から単核球を単離し、エピソーマルベクターで初期化因子 (<i>OCT4</i>, <i>SOX2</i>, <i>KLF4</i>, <i>L-MYC</i>, <i>LIN28</i>, <i>p53</i> shRNA) を導入することによって iPS 細胞の樹立を試みた (Okita K., et al. Stem Cells, 2013)。作製された細胞は染色体異常を認めず、患者と同じ遺伝子変異を有していた。また、この細胞は未分化多能性幹細胞に特異的なマーカーを発現し、胚様体形成および免疫不全マウスの精巣脂肪組織内への移植による奇形腫形成にて三胚葉への多分化能を有することが示され、iPS 細胞であることを確認した。次に、既報の肝細胞分化誘導プロトコール (Kajiwara M., et al. PNAS, 2012) を用いて CTLN1 患者由来 iPS 細胞を段階的に SOX17 陽性胚体内胚葉細胞、AFP 陽性肝芽細胞様細胞、ALBUMIN 陽性肝細胞様細胞 (HLC) に分化誘導を試みた。その結果、分化誘導された細胞は indocyanine green (ICG) や low density lipoprotein (LDL) を取り込み、グリコーゲンを蓄積するなど肝細胞の特徴を有していた。この CTLN1-HLC の培養系に塩化アンモニウム (NH₄Cl) を投与し、健康者 iPS 細胞由来 HLC (control-HLC) と比較したところ、CTLN1-HLC の尿素産生減少を確認した。さらに、CTLN1 に対する治療薬として</p>			

用いられている L-arginine 投与により、培地中のアンモニア除去と尿素産生の改善を認めた。また、尿素サイクル活性の低下が細胞内代謝産物に与える影響を明らかにするためにメタボローム解析を施行したところ、細胞内の尿素サイクル関連代謝産物は control-HLC と CTLN1-HLC 間で有意差は認めなかった。一方、クエン酸サイクル関連代謝産物に有意差を認め、ASS 酵素活性の異常がクエン酸サイクルに影響を及ぼす可能性が示唆された。
【 考 察 】
CTLN1 患者由来 iPS 細胞を樹立し、HLC への分化誘導と性状解析を行った。この CTLN1-HLC は患者の尿素代謝異常の一部を <i>in vitro</i> で再現し、CTLN1-HLC におけるアンモニア代謝異常に対しても L-arginine が有効であることを確認した。
（論文審査の結果の要旨）
この研究は尿素サイクル異常症であるシトルリン血症 1 型 (CTLN1) の患者由来ヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を遺伝子導入により初期化することで樹立し、あらゆる体細胞への分化能を有する細胞を作製した。この CTLN1-iPSC から肝細胞様細胞 (HLC) へ分化誘導することで病態解析を行った。その結果、CTLN1-HLC は肝臓のアンモニア処理能及び尿素産生能を呈し、CTLN1 に対する治療薬として用いられている L-arginine 投与により、培地中のアンモニア除去と尿素産生の改善を認めた。また、尿素サイクル活性の低下が細胞代謝産物に与える影響を明らかにするためにメタボローム解析を施行したところ、細胞内の尿素サイクル関連代謝産物は Control-HLC と CTLN1-HLC 間で優位差は認めなかった。一方、クエン酸サイクル関連代謝産物に有意差を認め、ASS 酵素活性の異常がクエン酸サイクルに影響を及ぼす可能性が示唆された。この CTLN1-HLC で CTLN1 を含めた尿素サイクル異常症の病態解明や治療薬の探索に用いて新たな治療法を見出す材料となるであろう。
以上の研究は CTLN1 病態の解明に貢献し CTLN1 の治療に寄与するところが多い。したがって、本論文は博士（ 医学 ）の学位論文として価値あるものと認める。
なお、本学位授与申請者は、平成 29 年 7 月 12 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。